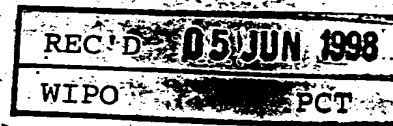


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Bescheinigung



09/403654

PRIORITY DOCUMENT

Die BASF Aktiengesellschaft in Ludwigshafen/Deutschland
hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Expression von Fungizid-bindenden Polypepti-
den in Pflanzen zur Erzeugung von Fungizidto-
leranz"

am 30. April 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 12 N, A 01 H und C 07 K der Internationalen Patent-
klassifikation erhalten.

München, den 2. April 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Joost

Ak. Zeichen: 197 18 251.8

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Fungizid-toleranten Pflanzen
5 durch Expression eines exogenen Fungizid-bindenden Polypeptids in den Pflanzen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es
10 sich bei dem exogenen Fungizid-bindenden Polypeptid um ein Einketten-Antikörperfragment handelt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es
15 sich bei dem exogenen Fungizid-bindenden Polypeptid um einen kompletten Antikörper oder um ein davon abgeleitetes Fragment handelt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es
20 sich bei dem Fungizid um methyl methoxyimino- α -(o-tolyloxy)-o-tolylacetate (BAS 490F) handelt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um mono- oder dikotyle Pflanzen handelt.
- 25 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Pflanze um Tabak handelt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression des exogenen Polypeptids konstitutiv
30 in der Pflanze erfolgt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression des exogenen Polypeptids in der
35 Pflanze induziert wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression des exogenen Polypeptids in den
Blättern der Pflanze erfolgt.
- 40 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression des exogenen Polypeptids in den Samen der Pflanze erfolgt.

2

11. Expressionskassette für Pflanzen bestehend aus einem Promotor, einem Signalpeptid, einem Gen codierend für die Expression eines exogenen Fungizid-bindenden Polypeptids, einem ER-Retentionssignal und einem Terminator.
- 5 12. Expressionskassette nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als konstitutiver Promotor der CaMV 35S-Promotor verwendet wird.
- 10 13. Expressionskassette nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als zu exprimierendes Gen das Gen eines Einketten-Antikörperfragmentes eingesetzt wird.
14. Expressionskassette nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als zu exprimierendes Gen das Gen oder Genfragment eines Fungizid-bindenden Polypeptides als Translationsfusion mit anderen funktionellen Proteinen wie zum Beispiel Enzymen, Toxinen, Chromophoren und Bindeproteinen eingesetzt wird.
- 15 14. Expressionskassette nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als zu exprimierendes Gen das Gen oder Genfragment eines Fungizid-bindenden Polypeptides als Translationsfusion mit anderen funktionellen Proteinen wie zum Beispiel Enzymen, Toxinen, Chromophoren und Bindeproteinen eingesetzt wird.
- 20 15. Expressionskassette nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das zu exprimierende Polypeptidgen aus einer Hybridomazelle oder mit Hilfe anderer rekombinanter Methoden - wie z.B. der Antikörper-Phage-Display Methode - gewonnen wird.
- 25 16. Verwendung der Expressionskassette nach Anspruch 11 zur Transformation von dicotylen oder monokotylen Pflanzen, die konstitutiv samen- oder blatt-spezifisch ein exogenes Fungizid-bindendes Polypeptid exprimieren.
- 30 17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man die Expressionskassette in einen Bakterienstamm transferiert und die entstandenen rekombinanten Klone zur Transformation von dicotylen oder monokotylen Pflanzen, die konstitutiv samen- oder blattspezifisch ein exogenes Fungizid-bindendes Polypeptid exprimieren, verwendet.
- 35 17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man die Expressionskassette in einen Bakterienstamm transferiert und die entstandenen rekombinanten Klone zur Transformation von dicotylen oder monokotylen Pflanzen, die konstitutiv samen- oder blattspezifisch ein exogenes Fungizid-bindendes Polypeptid exprimieren, verwendet.
18. Verwendung der Expressionskassette nach Anspruch 11, als Selektionsmarker.
- 40 19. Verwendung einer transformierten Pflanze wie nach Anspruch 17 oder 18 erhalten zur Herstellung eines Fungizid-bindenden Polypeptids.

3

20. Verfahren zur Transformation einer Pflanze durch Einbringen einer Gensequenz, die für ein Fungizid-bindendes Polypeptid codiert, in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze und Protoplasten von Pflanzenzellen.
- 5 21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe eines Agrobacteriums insbesondere der Art Agrobacterium tumefaciens erfolgt.
- 10 22. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe der Elektroporation erfolgt.
23. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe der particle bombardment Methode erfolgt.
- 15 24. Herstellung eines Fungizid-bindenden Polypeptides durch Expression eines Gens codierend für ein derartiges Polypeptid in einer Pflanze bzw. Zellen einer Pflanze und anschließende Isolierung des Polypeptides.
- 20 25. Pflanze enthaltend eine Expressionskassette gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Expressionskassette Toleranz gegenüber einem Fungizid vermittelt.
- 25 26. Pflanze nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß sie tolerant gegenüber methyl methoxyimino- α -(o-tolyloxy)-o-tolyacetate (BAS 490F) ist.
- 30 27. Verfahren zur Bekämpfung von phytopathogenen Pilzen in transgenen Fungizid-toleranten Kulturpflanzen dadurch gekennzeichnet, daß Fungizide eingesetzt werden, gegen die die Kulturpflanze Fungizid-bindende Polypeptide oder Antikörper bildet.
- 35 28. Fungizid-bindende Polypeptide bzw. Antikörper mit hoher Bindeaffinität zu methyl methoxyimino- α -(o-tolyloxy)-o-tolyacetate (BAS 490F), dadurch gekennzeichnet, daß sie gemäß Anspruch 24 hergestellt werden.

40

45

Abb. 1 Schematische Darstellung der Kasette zur samenspezifischen Expression des scFV-Gens.

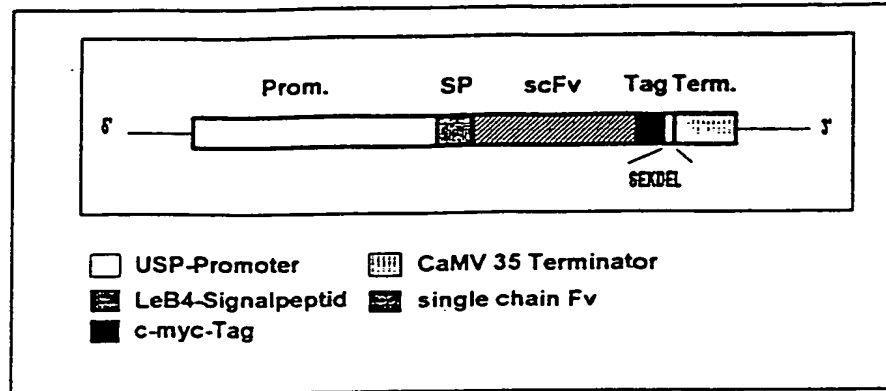


Abb. 2 Schematische Darstellung der Kassette zur Expression des scFv-Gens in Blättern transgener Tabakpflanzen.

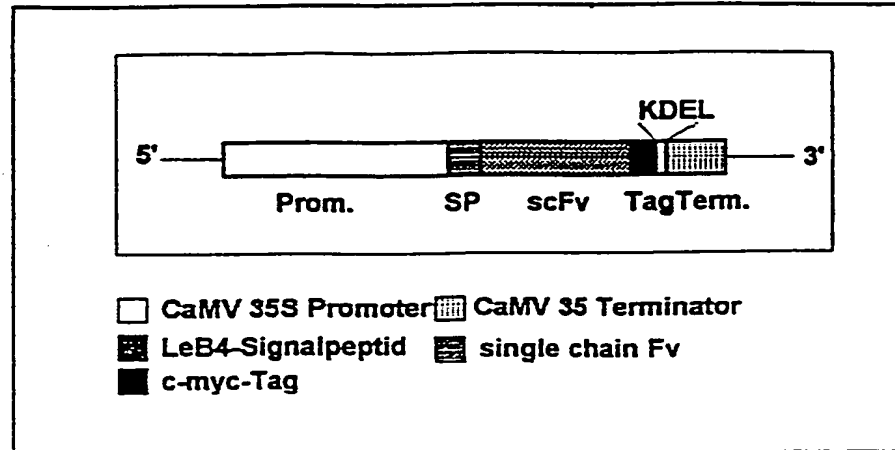
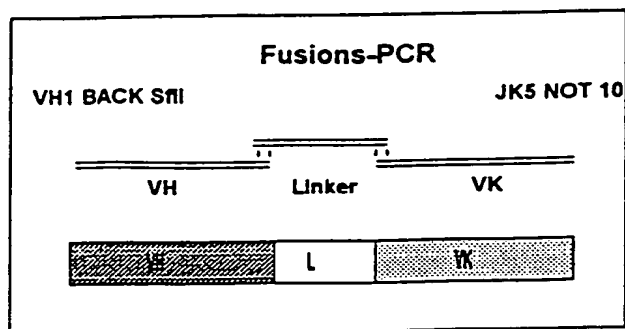
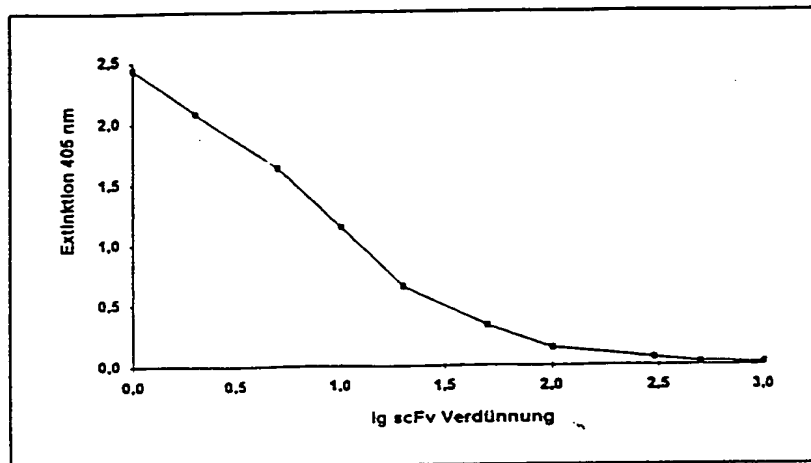


Abb.3 Schematische Darstellung der Konstruktion des scFv-anti-BAS 490F (V-Gen für V (variable Region, L-Linker).



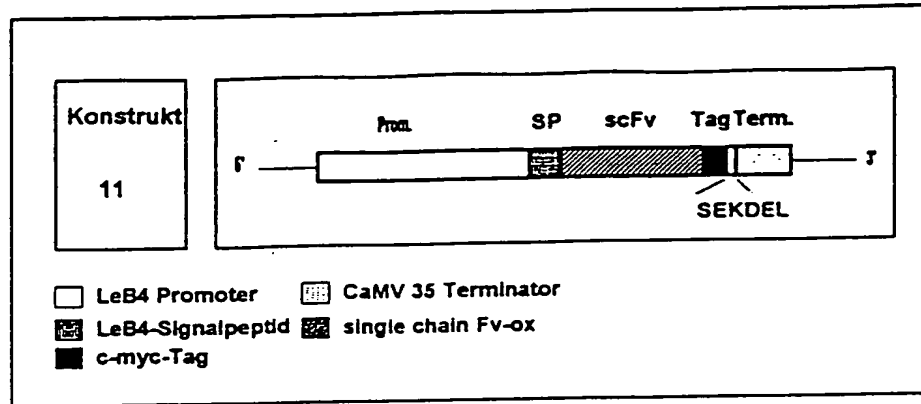
4

Abb. 4 Funktionelle Charakterisierung des scFv-antiBAS 490F im direkten ELISA.



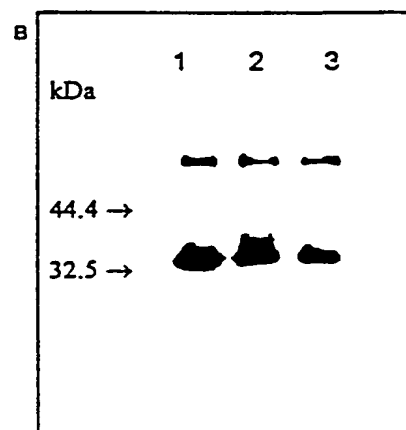
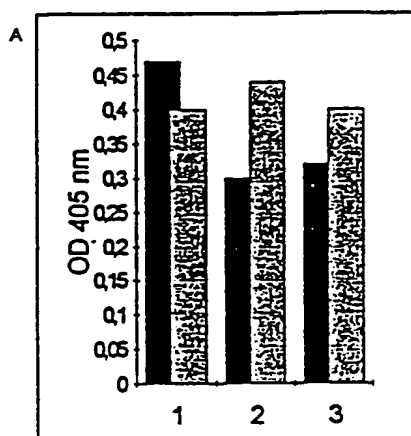
5

Abb. 5 Schematische Darstellung der Kassette zur samenspezifischen Expression des scFv-antiBAS 490F Gens.



6

Abb. 6 Nachweis des Erhaltes der Antigenbindungsaktivität des Antikörperfragmentes scFv-antiBAS 490F in Blättern nach Trocknung oder Lyophilisierung mittels ELISA-Tests. In Abb. 6 A ist die Antigenbindungsaktivität des aus frischen (1), lyophilisierten (2) und getrockneten Blättern (3) gereinigten scFv-antiBAS 490F Polypeptides dargestellt. In Abb. 6 B sind die jeweiligen Mengen an scFv-antiBAS 490F Protein (etwa 100 ng), die für die ELISA-Analysen eingesetzt wurden, mittels Western-Blot-Analysen bestimmt. Die Größen der Proteinmolekulargewichtsstandards sind links dargestellt.



Expression von Fungizid-bindenden Polypeptiden in Pflanzen zur
Erzeugung von Fungizidtoleranz

5. Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von fungizidtoleranten Pflanzen durch Expression eines exogenen Fungizid-bindenden Polypeptides in Pflanzen oder Pflanzenteilen. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der entsprechenden Nukleinsäuren codierend für ein Polypeptid, einen Antikörper oder Teilen eines Antikörpers mit Fungizid-bindenden Eigenschaften in transgenen Pflanzen und die auf diese Weise transformierte Pflanze selbst.

Es ist bekannt, daß mit Hilfe von gentechnischen Verfahren gezielt Fremdgene in das Genom einer Pflanze übertragen werden können. Dieser Prozeß wird als Transformation und die resultierenden Pflanzen werden als transgene Pflanzen bezeichnet. Transgene Pflanzen werden derzeit in unterschiedlichen biotechnologischen Bereichen eingesetzt. Beispiele sind insektenresistente Pflanzen (Vaek et al. Plant Cell 5 (1987), 159-169), virusresistente Pflanzen (Powell et al. Science 232 (1986), 738-743) und ozonresistente Pflanzen (Van Camp et al. BioTech. 12 (1994), 165-168). Beispiele für gentechnisch erzielte Qualitätssteigerungen sind: Erhöhung der Haltbarkeit von Früchten (Oeller et al. Science 254 (1991), 437-439), Erhöhung der Stärkeproduktion in Kartoffelknollen (Stark et al. Science 242 (1992), 419), Veränderung der Stärke- (Visser et al. Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 289-296) und Lipidzusammensetzung (Voelker et al. Science 257 (1992), 72-74) und Produktion pflanzenfremder Polymere (Poirer et al. Science 256 (1992), 520-523).

Ein wichtiges Ziel der pflanzenmolekulargenetischen Arbeiten ist die Erzeugung von Herbizidtoleranz. Die Herbizidtoleranz ist gekennzeichnet durch eine in Art oder Höhe gesteigerte Verträglichkeit der Pflanze oder von Pflanzenteilen gegenüber dem applizierten Herbizid. Diese kann auf verschiedene Arten bewerkstelligt werden. Die bekannten Methoden sind die Nutzung eines Metabolismus wie z.B. des pat-Gens im Zusammenhang mit der Glufosinat-Resistenz (WO 8705629) oder eines gegenüber dem Herbizid resistenten Zielenzym wie im Falle der Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase (WO 9204449), die resistent ist gegen Glyphosat, sowie die Verwendung eines Herbizids in Zell- und Gewebekultur zur Selektion toleranter Pflanzenzellen und daraus resultierender resistenter Pflanzen wie bei Acetyl CoA Carboxylase

Hemmstoffen beschrieben (US 5162602, US 5290696).

Antikörper sind Proteine als Bestandteil des Immunsystems. Allen Antikörpern gemeinsam ist ihre räumliche, globuläre Struktur, der
5 Aufbau aus leichter und schwerer Kette sowie ihre prinzipielle Fähigkeit, Moleküle oder Teile einer Molekülstruktur mit hoher Spezifität binden zu können (Alberts et al., in: Molekularbiologie der Zelle, 2. Auflage 1990, VCH Verlag, ISBN 3-527-27983-0, 1198-1237). Aufgrund dieser Eigenschaften wurden Antikörper für
10 vielfältige Aufgaben genutzt. Man unterscheidet dabei die Anwendung der Antikörper im tierischen und menschlichen Organismen, die sie produzieren, die sogenannte in-situ Anwendungen und die ex-situ Anwendungen, d.h. die Nutzung der Antikörper nach Isolierung aus den produzierenden Zellen oder Organismen (Whitelam und
15 Cockburn, TIPS Vol.1 , 8 (1996), 268-272).

Die Verwendung hybrider somatischer Zelllinien (Hybridomas) als Quelle für Antikörper gegen ganz bestimmte Antigene geht auf Arbeiten von Köhler und Milstein zurück (Nature 256 (1975) 495-97).
20 Nach diesem Verfahren lassen sich sogenannte monoklonalen Antikörper herstellen, die eine einheitliche Struktur besitzen und durch Zellfusion erzeugt werden. Dabei werden Milzzellen einer immunisierten Maus mit Zellen eines Mausmyeloms fusioniert. So entstehen Hybridomazellen, die sich unbegrenzt vermehren. Gleich-
25 zeitig sezernieren die Zellen spezifische Antikörper gegen das Antigen, mit dem die Maus immunisiert worden war. Die Milzzellen liefern die Fähigkeit zur Antikörperproduktion, während die Myelomzellen die unbegrenzte Wachstumsfähigkeit und die kontinuierliche Antikörpersekretion beisteuern. Da jede Hybridomazelle sich
30 als Klon von einer einzigen B-Zelle ableitet, besitzen alle erzeugten Antikörpermoleküle dieselbe Struktur einschließlich der Antigenbindungsstelle. Diese Methode hat die Anwendung von Antikörpern stark gefördert, da jetzt Antikörper mit einer einzigen, bekannten Spezifität und einer homogenen Struktur unbegrenzt zur
35 Verfügung stehen. Monoklonale Antikörper finden breite Anwendung in der Immundiagnostik und als Therapeutika.

Seit einigen Jahren gibt es die sogenannte Phagen-Display-Methode
40 zur Herstellung von Antikörpern, bei der das Immunsystem und die verschiedenen Immunisierungen im Tier umgangen werden. Hierbei wird die Affinität und Spezifität des Antikörpers in vitro maßgeschneidert (Winter et al., Ann. Rev. Immunol. 12 (1994), 433-455; Hoogenboom TIBTech Vol 15 (1997), 62 -70). Gensegmente, die die
45 kodierende Sequenz der variablen Region von Antikörpern enthält, d.h. die Antigen-Bindestelle, werden mit Genen für das Hüllprotein eines Bakteriophagen fusioniert. Dann infiziert man Bakte-

3

rien mit Phagen, die solche Fusionsgene enthalten. Die entstehenden Phagenpartikel besitzen nun Hüllen mit dem antikörperähnlichen Fusionsprotein, wobei die antikörperbindende Domäne nach außen zeigt. Aus einer solchen Phagen-Display-Bibliothek läßt sich nun der Phage isolieren, der das gewünschte Antikörperfragment enthält und spezifisch an ein bestimmtes Antigen bindet. Jeder so isolierte Phage erzeugt ein monoklonales, antigenbindendes Polypeptid, das einem monoklonalen Antikörper entspricht. Die Gene für die Antigenbindungsstelle, die für jeden Phagen einzigartig sind, kann man aus der Phagen-DNA isolieren und zur Konstruktion vollständiger Antikörpergene einsetzen.

Auf dem Gebiet des Pflanzenschutzes wurden Antikörper insbesondere als analytisches Mittel ex-situ zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Antigenen genutzt. Dies schließt den Nachweis von Pflanzeninhaltsstoffen, Herbiziden oder Fungiziden in Trinkwasser (Sharp et al. (1991) ACS Symp Ser., 446 (Pestic. Residues Food Saf.) 87-95), Bodenproben (WO 9423018) oder in Pflanzen oder Pflanzenteilen sowie die Nutzung von Antikörpern als Hilfsmittel zur Reinigung von gebundenen Molekülen ein.

Die Produktion von Immunglobulinen in Pflanzen wurde erstmals von Hiatt et al., Nature, 342 (1989), 76 - 78 beschrieben. Das Spektrum reicht von Ein-Ketten-Antikörpern bis zu multimeren sekretorischen Antikörpern (J. Ma und Mich Hein, 1996, Annuals New York Academy of Sciences, 72 - 81).

Neuere Versuche nutzen Antikörper in-situ zur Pathogenabwehr in Pflanzen, insbesondere von Viruserkrankungen durch Expression von spezifischen Antikörpern oder Teilen davon gerichtet gegen Virus-hüllproteine in Pflanzenzellen (Tavladoraki et al., Nature 366 (1993), 469-472; Voss et al., Mol. Breeding 1 (1995), 39-50).

Ein analoger Ansatz ist auch zur Abwehr der Infektion der Pflanze durch Nematoden genutzt worden (Rosso et al., Biochem Biophys Res Com, 220 (1996) 255-263). Für eine pharmazeutische Anwendung sind Beispiele bekannt, die die Antikörper-Expression in-situ in Pflanzen für eine orale Immunisierung nutzen (Ma et al., Science 268 (1995), 716-719; Mason und Arntzen, Tibtech Vol 13 (1996), 388-392). Von der Pflanze gebildete Antikörper werden dabei aus Pflanzen oder für den Verzehr geeigneten Pflanzenteilen über den Mund, Rachen oder Verdauungstrakt dem Körper zugeführt und verursachen einen wirksamen Immunschutz. Weiterhin wurde in Pflanzen bereits ein Ein-Ketten-Antikörper (single chain antibody) gegen das niedermolekulare Pflanzenhormon Abscisinsäure exprimiert und eine verringerte Pflanzenhormonverfügbarkeit aufgrund von Absci-

sinsäurebindung in der Pflanze beobachtet (Artsaenko et al., Plant Journal 8 (1995) 754-750).

Die chemische Pilzbekämpfung in agrarwirtschaftlich bedeutenden Kulturen setzt den Einsatz von hochselektiven Fungiziden ohne phytotoxische Wirkung voraus. Die phytotoxische Wirkung von Fungiziden kann beispielsweise auf einer Hemmung des Pflanzenwachstums, verminderter Photosyntheseleistung und damit verbundener verminderter Ertragsleistung beruhen. In einigen Fällen ist es jedoch schwierig, Fungizide mit ausreichender Selektivität zu entwickeln, die in allen bedeutenden Pflanzengroßkulturen einsetzbar sind und in keiner Kultur eine Schädigung der Ertragspflanze verursachen. Die Einführung von Fungizid-resistenten oder -toleranten Kulturpflanzen kann zur Lösung dieses Problems beitragen und neue Verwendungsmöglichkeiten von Fungiziden in bisher nicht oder nur unter Ertragsminderung behandelbaren Kulturen erschließen.

Der Entwicklung von Fungizid-resistenten Kulturpflanzen durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits die phytotoxische Wirkung bereits in Gewebekultur erfaßbar sein und andererseits können nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Selektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch wäre die Einbringung einer Resistenz durch Kreuzung auf Pflanzen der selben Art beschränkt.

Aus diesen Gründen ist der gentechnische Ansatz, ein für die Resistenz codierendes Gen zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen, dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen.

Die molekularbiologische Entwicklung von Herbizid-toleranten bzw. Herbizid-resistenten Kulturpflanzen setzt bisher voraus, daß der Wirkmechanismus des Herbizides in der Pflanze bekannt ist und daß Gene, die Resistenz gegen das Herbizid vermitteln gefunden werden können. Viele gegenwärtig kommerziell genutzte Herbizide wirken, indem sie ein Enzym einer essentiellen Aminosäure-, Lipid- oder Pigmentbiosynthese blockieren. Durch Veränderung der Gene dieser Enzyme dergestalt, daß das Herbizid nicht mehr gebunden werden kann und durch Einbringung dieser veränderten Gene in Kulturpflanzen läßt sich Herbizid-Toleranz erzeugen. Alternativ können zum Beispiel in der Natur analoge Enzyme beispielsweise in Mikro-

5

organismen gefunden werden, die eine natürliche Resistenz gegenüber dem Herbizid zeigen. Dieses Resistenz vermittelnde Gen wird aus einem derartigen Mikroorganismus isoliert, in geeignete Vektoren umkloniert und anschließend nach erfolgreicher Transformation in Herbizid-sensitiven Kulturpflanzen zur Expression gebracht (WO 96/38567).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung eines neuartigen allgemein einsetzbaren, gentechnologischen Verfahrens zur Erzeugung von Fungizid-toleranten transgenen Pflanzen.

Diese Aufgabe wurde überraschenderweise gelöst durch ein Verfahren der Expression eines exogenen Polypeptides, Antikörpers oder Teilen eines Antikörpers mit Fungizid-bindenden Eigenschaften in den Pflanzen.

Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Herstellung eines Fungizid-bindenden Antikörpers und die Klonierung des zugehörigen Gens bzw. Genfragmentes.

Es wird zunächst ein geeigneter Antikörper erzeugt, der das Fungizid bindet. Dies kann u.a. durch Immunisierung eines Wirbeltiers, meist Maus, Ratte, Hund, Pferd, Esel oder Ziege mit einem Antigen erfolgen. Das Antigen ist dabei eine fungizid wirksame Verbindung, die über eine funktionelle Gruppe an einen höheren molekularen Träger wie Rinderserumalbumin (BSA), Hühnereiweiß (Ovalbumin), keyhole limpet hemocyanin (KLH) oder andere Träger gekoppelt oder assoziiert vorliegt. Die Immunantwort wird nach mehrmaliger Antigenapplikation mit gängigen Methoden nachvollzogen und so ein geeignetes Antiserum isoliert. Dieser Ansatz liefert zunächst ein polyklonales Serum, das Antikörper mit unterschiedlichen Spezifitäten enthält. Für den gezielten in-situ Gebrauch ist es notwendig, die für einen einzelnen spezifischen monoklonalen Antikörper codierende Gensequenz zu isolieren. Zu diesem Zweck stehen verschiedene Wege offen. Der erste Ansatz nutzt die Fusion von Antikörper-produzierenden Zellen mit Krebszellen zu einer ständig Antikörper produzierenden Hybridomazellkultur, die durch Vereinzelung der enthaltenen Klone letztlich zu einer homogenen, einen definierten monoklonalen Antikörper produzierenden Zelllinie führt.

Aus einer derartigen monoklonalen Zelllinie wird die cDNA für den Antikörper bzw. Teile des Antikörpers, den sog. Ein-Ketten-Antikörper (single chain antibody - scFv) isoliert. Diese cDNA-Sequenzen können dann in Expressionskassetten kloniert und zur funktionellen Expression in prokaryotischen und eukaryotischen

Organismen, einschließlich Pflanzen genutzt werden.

Es ist auch möglich über Phagen-Display-Banken Antikörper zu selektieren, die Fungizidmoleküle binden und katalytisch in ein
5 Produkt mit nicht fungiziden Eigenschaften umsetzen. Methoden zur Herstellung katalytischer Antikörper sind in Janda et al., Science 275 (1997) 945-948, Chemical selection for catalysis in combinatorial Antibody libraries; Catalytic Antibodies, 1991, Ciba Foundation Symposium 159, Wiley- Interscience Publication
10 beschrieben. Durch Klonierung des Gens dieses katalytischen Antikörpers und dessen Expression in einer Pflanze kann im Prinzip ebenfalls eine Fungizid-resistente Pflanze erzeugt werden.

15 Gegenstand der Erfindung sind insbesondere Expressionskassetten, deren kodierende Sequenz für ein Fungizid-bindendes Polypeptid oder dessen funktionelles Äquivalent codiert, sowie deren Verwendung zur Herstellung einer Fungizid-toleranten Pflanze. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in eine erfindungsgemäße Expressions-
20 kassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die eine DNA-Sequenz aus einer Hybridomazelle enthalten, die für ein Polypeptid mit Fungizid-bindenden Eigenschaften codiert und die somit dem Wirt Resistenz gegen bestimmte Fungizide verleihen.
25

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der codierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressions-
30 kassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der codierenden Sequenz einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden codierenden Sequenz für
35 das Polypeptid mit Fungizid-bindenden Eigenschaften und/oder Transitpeptid operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, codierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funk-
40 tion bei der Expression der codierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, ins Mitochondrium, im Endo-
45 plasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak Mosaic Virus (Gallie et al., Nucl.

Acids Res. 15 (1987) 8693-8711).

- Als Promotoren der erfindungsgemäßen Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von
- 5 Fremdgene steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell
- 10 21(1980) 285-294). Dieser Promotor enthält unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195-2202).
- 15 Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen Polypeptids in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant.Mol.Biol.22(1993),361-366), ein
- 20 durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/1919443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO9321334) Promotor sind der
- 25 Literatur beschrieben und können u.a. verwendet werden.
- Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen sich die phytotoxische Fungizidwirkung entfaltet. Insbesondere zu
- 30 nennen sind Promotoren, die eine Blatt-spezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445-245).
- 35 Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnten Einketten-Antikörper stabil bis zu 0,67% des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10(1995), 1090-1094). Da auch eine Expression in ausgesäten oder keimenden Samen möglich und im Sinne
- 40 der vorliegenden Erfindung erwünscht sein kann, sind entsprechend Keimungs- und Samen-spezifische Promotoren ebenfalls erfindungsgemäß bevorzugte regulative Elemente. Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den USP- oder LEB4-Promotor, das
- 45 LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten. Der Aufbau der Kassette ist in der Abbildung 1 am Beispiel eines Einketten-Antikörpers (scFv-Gen) schematisch

beispielhaft dargestellt.

Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten Polypeptid-DNA und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Polypeptid-DNA insertierten für ein Chloroplasten-spezifisches Transitpeptid kodierenden DNA sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, Plastiden, die Vakuole, das Mitochondrium, das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423). Für die Menge der Proteinakkumulation in transgenen Pflanzen besonders förderlich erwiesen hat sich eine Lokalisation im ER sowie der Zellwand (Schouten et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792; Artsaenko et al., Plant J. 8 (1995) 745-750).

Gegenstand der Erfindung sind auch Expressionskassetten, deren kodierende Sequenz für ein Fungizid-bindendes Fusionsprotein kodiert, wobei Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Besonders bevorzugt sind Chloroplasten-spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des Fungizid-bindenden Polypeptides in die Pflanzenchloroplasten vom Fungizid-bindenden Polypeptid-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid abgeleitet von plastidärer Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase).

Die zur Herstellung erfindungsgemäßer Expressionskassetten erforderliche Polypeptid-DNA oder -cDNA wird vorzugsweise mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Verfahren zur DNA-Amplifikation mittels PCR sind bekannt, beispielsweise aus Innis et al., PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications,

Academic Press (1990). Zweckmäßigerweise können die PCR-erzeugten DNA-Fragmente durch Sequenzanalyse zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten überprüft werden.

- 5 Die insertierte Nucleotid-Sequenz codierend für ein Fungizid-bindendes Polypeptid kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten. Im allgemeinen werden synthetische Nucleotid-Sequenzen mit Codons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Codons können aus Codons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nucleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.
- 20 Zweckmäßigerweise sollten die erfindungsgemäßen Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der erfindungsgemäße Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die erfindungsgemäße Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den erfindungsgemäßen Promotor, eine beliebige Sequenz und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.
- 35 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.
- 40
- 45

10

Von besonderer Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg ist das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL (Schuoten, A. et al. Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

10 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

15 Eine erfindungsgemäße Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Der Aufbau der Kassette ist in Abbildung 2 am Beispiel eines Einketten-Antikörpers (scFv-Gen) schematisch dargestellt. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

25 Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein Polypeptid mit Fungizid-bindenden Eigenschaften codiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren. Mit einem solchen
30 Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien
35 kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38 und aus S.B. Gelvin, Molecular Genetics of T-DNA Transfer from Agrobacterium to Plants, gleichfalls in Transgenic Plants, S. 49-78. Aus den transformierten
40 Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die in die erfindungsgemäße Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines Polypeptides mit Fungizid-bindenden Eigenschaften
45 enthalten.

11

- Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für ein Fungizid-bindendes Polypeptid codierenden DNA wird eine erfindungsgemäße Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulatorische Signale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S.71-119 beschrieben.
- 10 Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die erfindungsgemäßen Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können, wie z.B. pBin19 (Bevan et al. (1980) Nucl. Acids Res. 12, 8711).
- 20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Vermittlung von Resistenz gegen Fungizide mit phytotoxischer Wirkung.
- 25 Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.
- 30 Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, der biolistische Ansatz mit der Genkanone, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Molec.Biol. 42 (1991) 205-225 beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu trans-

formieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711).

5 Mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Busch-, Baum-, Nuß- und Weinspezies, wie beispielsweise Kaffee, Obstbäume wie Apfel, Birnen oder Kirschen, Nußbäume wie Walnuß oder Pecan und besonders wichtig in Reben verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

15 Funktionell äquivalente Sequenzen, die ein Fungizid-bindendes Polypeptid codieren, sind erfindungsgemäß solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nucleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an die Codon-Usage einer Pflanze angepaßte, künstliche Nucleotid-Sequenzen.

25 Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten das Fungizid-bindende Polypeptid codierenden Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nucleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation dieser Nucleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen codierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

40 Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

45 Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Toleranz gegenüber Fungiziden zur Vermeidung phytotoxischer Effekte an Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter

13

Proteine, die Fungizid-bindende Aktivität aufweisen oder durch in vitro-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Codon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Codon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

- 10 Als weitere erfindungsgemäße geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein nicht-pflanzliches Fungizid-bindendes Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann
- 15 z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf scFvs Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das
- 20 Polypeptid mit Fungizid-bindenden Eigenschaften an den gewünschten Wirkort leitet.

- Gegenstand der Erfindung sind aber auch die erfindungsgemäß erzeugten Expressionsprodukte, sowie Fusionsproteine aus einem
- 25 Transitpeptid und einem Polypeptid mit Fungizid-bindenden Eigenschaften.

- Resistenz bzw. Toleranz bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Widerstandsfähigkeit von Pflanzen gegenüber Fungiziden mit phytotoxischer Wirkung. Sie umfaßt die partielle und, insbesondere, die vollständige Unempfindlichkeit gegenüber diesen Inhibitoren für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

- 35 Der phytotoxische Wirkort von Fungiziden ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des exogenen Fungizid-bindenden Polypeptides ausreichenden Schutz bieten kann. Es ist jedoch naheliegend, daß die phytotoxische Wirkung eines
- 40 Fungizids nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze gewebespezifisch erfolgen kann.

- Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen Fungizid-bindenden Polypeptides von Vorteil. Andererseits kann aber
- 45 auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

14

Die Wirksamkeit des transgen exprimierten Polypeptides mit Fungizid-bindenden Eigenschaften kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung auf Fungizid-haltigem Medium über abgestufte Konzentrationsreihen oder über Samenkeimungstests ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Fungizid-verträglichkeit einer Testpflanze in Gewächshausversuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Busch-, Baum-, Nuß- und Weinspecies wie beispielsweise Kaffee, Obstbäume wie Apfel, Birnen oder Kirschen, Nußbäume wie Walnuß oder Pecan und besonders wichtig die Rebe.

Die transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile können mit einem Fungizid mit phytotoxischer Wirkung, das die pflanzlichen Enzyme inhibiert, behandelt werden, wodurch die nicht erfolgreich transformierten Pflanzen, -zellen, -gewebe oder Pflanzenteile absterben bzw. geschädigt werden. Beispiele für geeignete Wirkstoffe sind Strobilurine insbesondere Methyl methoxyimino- α -(o-tolyloxy)-o-tolylacetate (BAS 490F), sowie Metabolite und funktionelle Derivate dieser Verbindungen. Die in die erfindungsgemäßen Expressionskassetten insertierte, für ein Polypeptid mit Fungizid-bindenden Eigenschaften codierende DNA, kann somit auch als Selektionsmarker verwendet werden.

Insbesondere bei Kulturpflanzen bietet die vorliegende Erfindung den Vorteil, daß nach Induktion einer selektiven Resistenz der Kulturpflanze gegenüber Fungiziden mit phytotoxischer Wirkung derartige Fungizide in diesen Kulturen auch mit höheren Aufwandsmengen zur Bekämpfung von Schadpilzen eingesetzt werden können, die sonst zu Pflanzenschäden führen würden. Als nicht-limitierende Beispiele für derartige Fungizide mit phytotoxischer Wirkung können Verbindungen aus den folgenden Gruppen genannt werden:

- Schwefel, Dithiocarbamate und deren Derivate, wie Ferridimethyldithiocarbamat, Zinkdimethyldithiocarbamat, Zinkethylenbis-dithiocarbamat, Manganethylenbisdithiocarbamat, Mangan-Zink-ethylen-diamin-bis-dithiocarbamat, Tetramethylthiuramdisulfide, Ammoniak-Komplex von Zink-(N,N-ethylen-bis-dithiocarbamat), Ammoniak-Komplex von Zink-(N,N'-propylen-bis-dithiocarbamat),

15

Zink-(N,N'-propylenbis-dithiocarbamat), N,N'-Polypropylenbis-(thiocarbamoyl)disulfid;

- Nitroderivate, wie Dinitro-(1-methylheptyl)-phenylcrotonat, 2-sec-Butyl-4,6-dinitrophenyl-3,3-dimethylacrylat, 2-sec-Butyl-4,6-dinitrophenyl-isopropylcarbonat, 5-Nitro-isophthalsäure-di-isopropylester;
- heterocyclische Substanzen, wie 2-Heptadecyl-2-imidazolinacetat, 2,4-Dichlor-6-(o-chloranilino)-s-triazin, O,O-Diethylphthalimidophosphonothioat, 5-Amino-1-[bis-(dimethylamino)-phosphinyl]-3-phenyl-1,2,4-triazol, 2,3-Dicyano-1,4-dithioanthrachinon, 2-Thio-1,3-dithiolo[4,5-b]chinoxalin, 1-(Butylcarbamoyl)-2-benzimidazol-carbaminsäuremethylester, 2-Methoxycarbonylamino-benzimidazol, 2-(Furyl-(2))-benzimidazol, 2-(Thiazolyl-(4))-benzimidazol, N-(1,1,2,2-Tetrachlorethylthio)-tetrahydrophthalimid, N-Trichlormethylthio-tetrahydrophthalimid, N-Trichlormethylthio-phthalimid;
- N-Dichlorfluormethylthio-N',N'-dimethyl-N-phenyl-schwefelsäurediamid, 5-Ethoxy-3-trichlormethyl-1,2,3-thiadiazol, 2-Rhodanmethylthiobenzthiazol, 1,4-Dichlor-2,5-dimethoxybenzol, 4-(2-Chlorphenylhydrazono)-3-methyl-5-isoxazon, Pyridin-2-thio-1-oxid, 8-Hydroxychinolin bzw. dessen Kupfersalz, 2,3-Dihydro-5-carboxanilido-6-methyl-1,4-oxathiin, 2,3-Dihydro-5-carboxanilido-6-methyl-1,4-oxathiin-4,4-dioxid, 2-Methyl-5,6-dihydro-4H-pyran-3-carbonsäure-anilid, 2-Methyl-furan-3-carbonsäureanilid, 2,5-Dimethyl-furan-3-carbonsäureanilid, 2,4,5-Trimethyl-furan-3-carbonsäureanilid, 2,5-Dimethyl-furan-3-carbonsäurecyclohexylamid, N-Cyclohexyl-N-methoxy-2,5-dimethyl-furan-3-carbonsäureamid, 2-Methyl-benzoesäure-anilid, 2-Iod-benzoesäure-anilid, N-Formyl-N-morpholin-2,2,2-trichlorethylacetal, Piperazin-1,4-diylbis-1-(2,2,2-trichlorethyl)-formamid, 1-(3,4-Dichloranilino)-1-formylamino-2,2,2-trichlorethan;
- Amine wie 2,6-Dimethyl-N-tridecyl-morpholin bzw. dessen Salze, 2,6-Dimethyl-N-cyclododecyl-morpholin bzw. dessen Salze, N-[3-(p-tert.-Butylphenyl)-2-methylpropyl]-cis-2,6-dimethyl-morpholin, N-[3-(p-tert.-Butylphenyl)-2-methylpropyl]-piperidin, (8-(1,1-Dimethylethyl)-N-ethyl-N-propyl-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-2-methanamin;
- Azole wie 1-[2-(2,4-Dichlorphenyl)-4-ethyl-1,3-dioxolan-2-yl-ethyl]-1H-1,2,4-triazol, 1-[2-(2,4-Dichlorphenyl)-4-n-propyl-1,3-dioxolan-2-yl-ethyl]-1H-1,2,4-triazol, N-(n-Propyl)-N-(2,4,6-trichlorphenoxyethyl)-N'-imidazol-yl-harnstoff, 1-(4-Chlorphenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-2-butanon, 1-(4-Chlorphenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-2-butanol, (2RS,3RS)-1-[3-(2-Chlorphenyl)-2-(4-fluorphenyl)-oxiran-2-ylmethyl]-1H-1,2,4-triazol, 1-[2-(2,4-Dichlorphenyl)-pentyl]-1H-1,2,4-triazol, 2,4'-Difluor-

16

- α -(1H-1,2,4-triazolyl-1-methyl)-benzhydrylalkohol, ,
1-((bis-(4-Fluorphenyl)-methylsilyl)-methyl)-1H-1,2,4-triazol,
1-[2RS,4RS;2RS,4SR]-4-brom-2-(2,4-dichlorphenyl)tetrahydrofu-
ryl]-1H-1,2,4-triazol, 2--(4-Chlorphenyl)-3-cyclopro-
5 pyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-butan-2-ol,
(+)-4-Chlor-4-[4-methyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylme-
thyl)-1,3-dioxolan-2-yl]-phenyl-4-chlorphenylether,
(E)-(R,S)-1-(2,4-dichlorphenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-tria-
zol-1-yl)pent-1-en-3-ol, 4-(4-Chlorphenyl)-2-phe-
10 nyl-2-(1H-1,2,4-triazolylmethyl)-butyronitril, 3-(2,4-dichlor-
phenyl)-6-fluor-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)chinazolin-4(3H)-on,
(R,S)-2-(2,4-Dichlorphenyl)-1-H-1,2,4-triazol-1-yl)-hex-
ano-2-ol, (1RS,5RS;1RS,5SR)-5-(4-chlorbenzyl)-2,2-dime-
thyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)cyclopentanol,
15 (R,S)-1-(4-chlorphenyl)-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl-
methyl)pentan-3-ol, (+)-2-(2,4-Dichlorphe-
nyl)-3-(1H-1,2,4-triazolyl)-propyl-1,1,2,2-tetrafluorethy-
lether, (E)-1-[1-[4-Chlor-2-trifluormethyl)-phe-
nyl]-imino)-2-propoxyethyl]-1H-imidazol, 2-(4-Chlorphe-
20 nyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-hexannitril,
 α -(2-Chlorphenyl)- α -(4-chlorphenyl)-5-pyrimidin-methanol, 5-Bu-
tyl-2-dimethylamino-4-hydroxy-6-methyl-pyrimidin, Bis-(p-chlor-
phenyl)-3-pyridinmethanol, 1,2-Bis-(3-ethoxycarbonyl-2-thiou-
reido)-benzol, 1,2-Bis-(3-methoxycarbonyl-2-thioureido)-benzol,
25 • Strobilurine wie Methyl-E-methoxyimino-[α -(o-tolyloxy)-o-to-
lyl]acetat, Methyl-E-2-{2-[6-(2-cyanophenoxy)-pyrimi-
din-4-yloxy]-phenyl}-3-methoxyacrylat, Methyl-E-methoxyi-
mino-[α -(2-
30 phenoxyphenyl)]-acetamid, Methyl-E-methoxyimino-[α -(2,5-dime-
thylphenoxy)-o-tolyl]-acetamid,
• Anilinopyrimidine wie N-(4,6-Dimethylpyrimidin-2-yl)-anilin,
N-[4-Methyl-6-(1-propinyl)-pyrimidin-2-yl]-anilin,
N-[4-Methyl-6-cyclopropyl-pyrimidin-2-yl]-anilin,
35 • Phenylpyrrole wie 4-(2,2-Difluor-1,3-benzodioxol-4-yl)-pyr-
rol-3-carbonitril,
• Zimtsäureamide wie 3-(4-Chlorphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphe-
nyl)-acrylsäuremorpholid,
40 • sowie verschiedene Fungizide, wie Dodecylguanidinacetat, 3-[3-
(3,5-Dimethyl-2-oxycyclohexyl)-2-hydroxyethyl]-glutarimid, N-
Methyl-, N-ethyl-(4-trifluormethyl,-2-[3',4'-dimethoxyphe-
nyl]-benzoesäureamid, Hexachlorbenzol, DL-Methyl-N-(2,6-dime-
thyl-phenyl)-N-furoyl(2)-alaninat, DL-N-(2,6-Dimethyl-phe-
nyl)-N-(2'-methoxyacetyl)-alanin-methyl- ester, N-(2,6-Dime-
45 thylphenyl)-N-chloracetyl-D,L-2-aminobutyrolacton, DL-
N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(phenylacetyl)-alaninmethylester,
5-Methyl-5-vinyl-3-(3,5-dichlorphenyl)-2,4-dioxo-1,3-oxazoli-

17

- 5 din, 3-[3,5-Dichlorphenyl(-5-methyl-5-methoxymethyl)-1,3-oxazolidin-2,4-dion, 3-(3,5-Dichlorphenyl)-1-isopropylcarbamoylhydantoin, N-(3,5-Dichlorphenyl)-1,2-dimethylcyclopropan-1,2-dicarbonensäureimid, 2-Cyano-[N-(ethylaminocarbonyl)-2-methoximino]-acetamid, N-(3-Chlor-2,6-dinitro-4-trifluormethylphenyl)-5-trifluormethyl-3-chlor-2-aminopyridin

- 10 Funktionell äquivalente Derivate dieser Fungizide besitzen ein vergleichbares Wirkungsspektrum gegen phytopathogene Pilze wie die konkret genannten Substanzen, bei niedrigerer, gleicher oder höherer phytotoxischer Aktivität.
- 15 Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Klonierungsverfahren

- 20 Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von
- 25 Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

- 30 Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (E. coli, XL-I Blue) wurden von Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (Agrobacterium tumefaciens, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kan) wurde von Deblaere et al. beschrieben (Nucl. Acids Res. 13 (1985) 4777). Alternativ
- 35 können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung wurden die Vektoren pUC19- (Yanish-Perron, Gene 33(1985), 103-119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12(1984) 8711-8720) und
- 40 pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 221-230) benutzt.

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

- 45 Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Pharmacia nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA

74 (1977), 5463-5467).

Erzeugung pflanzlicher Expressionskassetten

- 5 In das Plasmid pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12, 8711 (1984)) wurde ein 35S CaMV Promotor als EcoRI-KpnI-Fragment (entsprechend den Nukleotiden 6909-7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus (Franck et al. Cell 21 (1980) 285) inseriert. Das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmides pTiACH5
10 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835), Nukleotide 11749-11939 wurde als PvuII-HindIII-Fragment isoliert und nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnittstelle zwischen die SphI-HindIII Schnittstelle des Vektors kloniert. Es entstand das Plasmid pBi-
15 nAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 221-230).

Anwendungsbeispiele

Beispiel 1

20

- Da Fungizide nicht immunogen sind, müssen sie an ein Trägermaterial wie z.B. KLH gekoppelt werden. Befindet sich eine reaktive Gruppe im Molekül, kann diese Kopplung direkt erfolgen, ansonsten wird während der Synthese des Fungizides eine funktionelle Gruppe eingeführt oder eine reaktive Vorstufe während der
25 Synthese ausgesucht, um diese Moleküle in einem einfachen Reaktionsschritt an das Trägermolekül zu koppeln. Beispiele für Kopplungen sind bei Miroslavic Ferencik in "Handbook of Immunochimistry", 1993, Chapman & Hall, im Kapitel Antigene, Seite 20 -
30 49 beschrieben.

- Durch wiederholte Injektion dieses modifizierten Trägermoleküls (Antigens) werden z.B. Balb/c-Mäuse immunisiert. Sobald im Serum genügend Antikörper mit Bindung an das Antigen im ELISA (enzyme
35 linked immuno sorbent assay) nachweisbar sind, werden die Milzzellen dieser Tiere entnommen und mit Myelomzellen fusioniert um Hybride zu kultivieren. Im ELISA wird zusätzlich als Antigen "Fungizid-modifiziertes BSA" verwendet, um die gegen das Hapten gerichtete Immunantwort von der KLH-Antwort zu unterscheiden.
40

- Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern erfolgt in Anlehnung an bekannte Methoden, wie z.B. beschrieben in "Practical Immunology", Leslie Hudson und Frank Hay, Blackwell Scientific
45 Publications, 1989 oder in "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", James Goding, 1983, Academic Press, Inc., oder in "A practical guide to monoclonal antibodies", J.Liddell und A.

Cryer, 1991, John Wiley & Sons; oder Achim Möller und Franz Emling "Monokonale Antikörper gegen TNF und deren Verwendung". Europäische Patentschrift EP-A260610.

5 Beispiel 2

Ausgangspunkt der Untersuchung war ein monoklonaler Antikörper der spezifisch das Fungizid BAS 490F erkennt und der außerdem eine hohe Bindungsaffinität aufweist. Die selektionierte Hybridomazelllinie ist dadurch charakterisiert, daß die sekretierten, gegen das Fungizid-Antigen BAS 490F gerichteten monoklonalen Antikörper eine hohe Affinität aufweisen und die spezifischen Sequenzen der Immunglobuline verfügbar sind (Berek et al., 1985). Dieser monoklonale Antikörper gegen BAS 490F war Ausgangspunkt für die Konstruktion des Einketten-Antikörperfragmentes (scFv-antiBAS 490F).

Zunächst wurde mRNA aus den Hybridomzellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente als Matrize für die Amplifikation der variablen Immunglobulingene VH und VK mit den spezifischen Primern VH1 BACK und VH FOR-2 für die schwere Kette sowie VK2 BACK und MJK5 FON X für die leichte Kette (Clackson et al., 1991). Die isolierten variablen Immunglobuline waren Ausgangspunkt für die Konstruktion eines Einketten-Antikörperfragmentes (scFv-antiBAS 490F). Bei der nachfolgenden Fusions-PCR wurden drei Komponenten VH, VK und ein Linkerfragment in einem PCR-Reaktionsansatz vereinigt und das scFv-antiBAS 490F amplifiziert (Abb. 3).

Die funktionelle Charakterisierung (Antigenbindungsaktivität) des konstruierten scFv-antiBAS 490F-Gens erfolgte nach Expression in einem bakteriellen System. Das scFv-antiBAS 490F wurde dazu nach der Methode von Hoogenboom et al., 1991 als lösliches Antikörperfragment in E.coli synthetisiert. Die Aktivität und die Spezifität des konstruierten Antikörperfragmentes wurden in ELISA-Tests überprüft (Abb. 4).

Um eine samenspezifische Expression des Antikörperfragmentes in Tabak zu ermöglichen, wurde das scFv-antiBAS 490F Gen stromabwärts vom LeB4-Promotor kloniert. Der aus Vicia faba isolierte LeB4-Promotor zeigt eine streng samenspezifische Expression von verschiedenen Fremdgenen in Tabak (Bäumlein et al., 1991). Durch Transport des scFv-antiBAS 490F Polypeptides in das endoplasmatische Retikulum wurde eine stabile Akkumulation hoher Antikörperfragmentmengen erreicht. Das scFv-antiBAS 490F Gen wurde zu diesem Zweck mit einer Signalpeptidsequenz, die den Eintritt in das

20

endoplasmatische Retikulum und dem ER-Retentionssignal SEKDEL, das ein Verbleiben im ER gewährleistet (Wandelt et al., 1992), fusioniert (Abb. 5).

- 5 Die konstruierte Expressionskassette wurde in den binären Vektor pGSGLuc 1 (Saito et al., 1990) kloniert und durch Elektroporation in den Agrobakterium-Stamm EHA 101 transferiert. Rekombinante Agrobakterienklone wurden für die nachfolgende Transformation von *Nicotiana tabacum* verwendet. Pro Konstrukt wurden 70-140 Tabak-
- 10 pflanzen regeneriert. Von den regenerierten transgenen Tabakpflanzen wurden nach Selbstbefruchtung Samen verschiedener Entwicklungsstadien geerntet. Von diesen Samen wurden die löslichen Proteine nach Extraktion in einem wässrigen Puffersystem erhalten. Die Analyse der transgenen Pflanzen zeigt, daß durch die Fusion des scFv-antiBAS 490F Gens mit der DNA-Sequenz des ER-Retentionssignals SEKDEL eine maximale Akkumulation von 1,9 % scFv-antiBAS 490F Protein im reifen Samen erzielt werden konnte.

- 20 Das konstruierte scFv-antiBAS 490F Gen hatte eine Größe von ca. 735 bp. Die variablen Domänen wurden in der Reihenfolge VH-L-VL miteinander fusioniert.

- 25 Die spezifische Selektivität wurde in den Extrakten der reifen Tabaksamen mit einem direkten ELISA bestimmt. Die dabei erhaltenen Werte zeigen deutlich, daß die Proteinextrakte funktionell aktive Antikörperfragmente enthalten.

Beispiel 3

30

Samenspezifische Expression und Anreicherung von Einzelketten-Antikörperfragmenten im endoplasmatischen Retikulum von Zellen transgener Tabaksamen kontrolliert durch den USP- Promotor.

- 35 Ausgangspunkt der Untersuchungen war ein Einzelketten-Antikörperfragment gegen das Fungizid BAS 490F (scFv-anti BAS 490F). Die funktionelle Charakterisierung (Antigenbindungsaktivität) dieses konstruierten scFv-anti- BAS 490F Genes erfolgte nach Expression in einem bakteriellen System und nach Expression in Tabakblättern. Die Aktivität und die Spezifität des konstruierten Antikörperfragmentes wurde in ELISA-Tests überprüft.

- 45 Um eine samenspezifische Expression des Antikörperfragmentes in Tabak zu ermöglichen, wurde das scFv-antiBAS 490F Gen stromabwärts vom USP-Promotor kloniert. Der aus *Vicia faba* isolierte USP-Promotor zeigt eine streng samenspezifische Expression von

21

verschiedenene Fremdgenen in Tabak (Fiedler et al., 1993). Durch Transport des scFv-antiBAS 490F Polypeptides in das endoplasmatische Retikulum wurde eine stabile Akkumulation hoher Antikörperfragmentmengen erreicht. Das scFv-antiBAS 490F Gen wurden zu diesem Zweck mit einer Signalpeptidsequenz, die den Eintritt in das endoplasmatische Retikulum und dem ER-Retentionssignal SEKDEL, das ein Verbleiben im ER gewährleistet (Wandelt et al., 1992), fusioniert (Abb. 1).

- 10 Die konstruierte Expressionskassette wurde in den binären Vektor pGSGLUC1 (Saito et al., 1990) kloniert und durch Elektroporation in den Agrobakterium-Stamm EHA 101 transferiert. Rekombinante Agrobaktienklone wurden für die nachfolgende Transformation von Nicotiana tabacum verwendet. Von den regenerierten transgenen Tabakpflanzen wurden nach Selbstbefruchtung Samen verschiedener Entwicklungsstadien geerntet. Von diesen Samen wurden die löslichen Proteine nach Extraktion in einem wässrigen Puffersystem erhalten. Die Analyse der transgenen Pflanzen zeigt, daß durch die Fusion des scFv-antiBAS 490F Gens mit der DNA-Sequenz des ER-Retentionssignals SEKDEL unter Kontrolle des USP-Promotors bereits ab Tag 10 der Samenentwicklung Einketten-Antikörperfragmente mit Bindeaffinität für BAS 490F synthetisiert wurden.

25 Beispiel 4

- Um eine ubiquitäre Expression des Antikörperfragmentes in der Pflanze, speziell in Blättern, zu erreichen, wurde das scFv-antiBAS 490F -Gen stromabwärts vom CaMV 35 S-Promotor kloniert. Dieser starke konstitutive Promotor vermittelt eine Expression von Fremdgenen in nahezu allen pflanzlichen Geweben (Benfey und Chua, Science 250 (1990), 956 - 966. Durch Transport des scFv-antiBAS 490F Proteins in das endoplasmatische Retikulum wurde eine stabile Akkumulation hoher Antikörperfragmentmengen im Blattmaterial erreicht. Das scFv-antiBAS 490F Gen wurde zunächst mit einer Signalpeptidsequenz, die den Eintritt in das endoplasmatische Retikulum und dem ER-Retentionssignal KDEL, das ein Verbleiben im ER gewährleistet (Wandelt et al., Plant J. 2(1992), 181 - 192) fusioniert. Die konstruierte Expressionskassette wurde in den binären Vektor pGSGLUC 1 (Saito et al., Plant Cell Rep. 8(1990), 718 - 721) kloniert und durch Elektroporation in den Agrobakterium-Stamm EHA 101 transferiert. Rekombinante Agrobakterienklone wurden für die nachfolgende Transformation von Nicotiana tabacum verwendet. Es wurden ungefähr 100 Tabakpflanzen regeneriert. Von den regenerierten transgenen Tabakpflanzen wurde Blattmaterial verschiedenener Entwicklungsstufen entnommen. Von diesem Blattmaterial wurden die löslichen Proteine nach Extraktion in einem

22

wässrigen Puffersystem erhalten. Nachfolgende Analysen (Western-Blot-Analysen und ELISA-Tests) zeigten, daß in den Blättern eine maximale Akkumulation von größer 2 % an biologisch aktivem, antigenbindendem scFv-antiBAS 490F Polypeptid erzielt werden konnte.

- 5 Die hohen Expressionswerte wurden in ausgewachsenen grünen Blättern ermittelt, aber auch in seneszentem Blattmaterial konnte das Antikörperfragment nachgewiesen werden.

Beispiel 5

10

PCR-Amplifikation eines Fragmentes der cDNA codierend für den Ein-Ketten-Antikörper gegen BAS 490F mithilfe synthetischer Oligonukleotide.

15

Die PCR-Amplifikation der Ein-Ketten-Antikörper cDNA wurde in einem DNA-Thermal Cycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Die Reaktionsgemische enthielten 8 ng/ μ l einzelsträngige Matrizen-cDNA, 0,5 μ M der entsprechenden Oligonukleotide,

20

200 μ M Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C, 1,5mM MgCl₂) und 0.02 U/ μ l Taq Polymerase (Perkin Elmer). Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

Anlagerungstemperatur:	45°C
25 Denaturierungstemperatur:	94°C,
Elongationstemperatur:	72°C,
Anzahl der Zyklen:	40

- 30 Es resultierte ein Fragment von ca. 735 Basenpaaren, das in den Vektor pBluescript ligiert wurde. Mit dem Ligationsansatz wurde E. coli XL-I Blue transformiert und das Plasmid amplifiziert. Zur Anwendung und Optimierung der Polymerase Kettenreaktion siehe: Innis et al., 1990, PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, Academic Press.

35

Beispiel 6

- 40 Herstellung transgener Tabakpflanzen, die eine cDNA codierend für einen Ein-Ketten-Antikörper mit Fungizid-bindenden Eigenschaften exprimieren.

- 45 Das Plasmid pGSGLuc 1 wurde in Agrobacterium tumefaciens C58C1:pGV2260 transformiert. Zur Transformation von Tabakpflanzen (Nicotiana tabacum cv. Samsun NN) wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Physiol. Plant. 15 (1962)

23

473 ff.) mit 2% Saccharose (2MS-Medium) benutzt. Blattscheiben steriler Pflanzen (zu je ca. 1 cm²) wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgte eine 2-tägige Inkubation in Dunkelheit bei 5 25°C auf 2MS-Medium mit 0,8% Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde nach 2 Tagen mit 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit weitergeführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 1 mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0,2 mg/l Naphtylelessigsäure und 1,6 g/l Glukose 10 weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2% Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8% Bacto-Agar überführt.

Beispiel 7

- 15 Stabile Akkumulation des Einketten-Antikörperfragmentes gegen das Fungizid BAS 490F im endoplasmatischen Retikulum.

Ausgangspunkt der Untersuchungen war ein in Tabakpflanzen exprimiertes Einketten-Antikörperfragment gegen das Fungizid BAS 20 490F (scFv-anti BAS 490F). Menge und Aktivität des synthetisierten scFv-antiBAS 490F Polypeptides wurden in Western-Blot-Analysen und ELISA-Tests bestimmt.

- 25 Um eine Expression des scFv-antiBAS 490F-Gens im endoplasmatischen Retikulum zu ermöglichen, wurde das Fremdgen unter der Kontrolle des CaMV 53S-Promotors als eine Translationsfusion mit dem LeB4-Signalpeptid (N-terminal) und dem ER-Retentionssignal KDEL (C-terminal) exprimiert. Durch Transport des scFv-anti- 30 BAS 490F Polypeptids in das endoplasmatische Retikulum wurde eine stabile Akkumulation hoher Mengen an aktivem Antikörperfragment erreicht. Nach Ernte des Blattmaterials wurden Stücke bei -200 C eingefroren, lyophilisiert oder bei Raumtemperatur getrocknet. Die löslichen Proteine wurden aus dem jeweiligen Blattmaterial 35 durch Extraktion in einem wässrigen Puffer erhalten und das scFv-antiBAS 490F Polypeptid affinitätschromatographisch gereinigt. Gleiche Mengen an gereinigtem scFv-antiBAS 490F Polypeptids (eingefroren, lyophilisiert und getrocknet) wurden für die Bestimmung der Aktivität des Antikörperfragmentes eingesetzt 40 (Abb. 6). Dabei wurden etwa gleiche Antigenbindungsaktivitäten festgestellt.

Beispiel 8

- 45 Zum Nachweis der Fungizid-Toleranz der ein Polypeptid mit Fungizid-bindenden Eigenschaften produzierenden transgenen Tabakpflanzen wurden diese mit unterschiedlichen Mengen BAS 490F behandelt.

24

In allen Fällen konnte im Gewächshaus gezeigt werden, daß die ein scFv-antiBAS 490F Gen exprimierenden Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle eine höhere Toleranz gegenüber dem Fungizid BAS 490F und geringere phytotoxische Wirkungen zeigen.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Expression von Fungizid-bindenden Polypeptiden in Pflanzen zur
Erzeugung von Fungizidtoleranz

5 Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von Fungizid-toleranten Pflanzen durch
Expression eines Fungizid-bindenden Antikörpers in den Pflanzen.

10

15

20

25

30

35

40

45

This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE IS BLANK